

Auflösungssteigerung mittels bildinvertierender, digitaler holographischer Interferometrie für die Mikroskopie

Tino Elsmann, A. Kießling, R. Kowarschik

Institut für Angewandte Optik, Friedrich Schiller Universität Jena

<mailto:tino.elsmann@uni-jena.de>

Die Auflösung eines optischen Systems kann mittels Bildinversionsverfahren deutlich gesteigert werden. Unter Verwendung der digitalen Holographie ist es möglich, dieses Verfahren numerisch umzusetzen. Insbesondere das notwendige Abrastern des Objektes kann hierbei auf den Computer ausgelagert werden, was zu einer verkürzten Messzeit führt.

1 Einleitung

Die Auflösung eines optischen Systems kann durch die Pointspreadfunction (PSF) beschrieben werden. Eine Auflösungssteigerung bedeutet also, die Breite der PSF zu verringern. Eine Möglichkeit dazu liegt in der Verwendung des Bildinversionsverfahren [1, 2]. Dieses Verfahren wurde bereits experimentell umgesetzt [3, 4].

2 Grundlagen - Klassisches Bildinversionsverfahren

Beim Bildinversionsverfahren wird das Bild eines Objektes mit Hilfe eines Interferometers beobachtet. In einem der beiden Interferometerarme wird das Bild jedoch räumlich invertiert, wobei die optische Achse als Inversionsachse dient. Betrachtet man die Amplitudenverteilung einer Punktlichtquelle, so erhält man:

$$u(r, r_0) = h * [\delta(r - r_0) + \delta(r + r_0)] \quad (1)$$

wobei h die Systemantwort bzw. die Amplituden-PSF (APSF) ist. Für eine Punktlichtquelle besitzt sie die Form:

$$h(r) = \frac{2J_1\left(\frac{2\pi \cdot NA}{\lambda} r\right)}{\frac{2\pi \cdot NA}{\lambda} r} = \frac{2J_1(pr)}{pr} \quad (2)$$

J_1 entspricht der Besselfunktion erster Ordnung. Die Interferenz der Punktlichtquelle mit ihrem räumlich invertierten Pendant führt zu folgendem Ausdruck:

$$I(r, r_0) = I_{orig} + I_{inver} \pm 2 \cdot h(r - r_0) h(r + r_0) \quad (3)$$

Durch Subtraktion der Verteilung des destruktiven Ausgangs vom konstruktiven erhält man nur noch den Wechselwirkungsterm. Anschließend muss man über die gesamte Bildebene integrieren. Die Integration über das Produkt der beiden durch ihr Argument geteilten Besselfunktionen ergibt wieder eine solche Funktion - nun jedoch des doppelten

Argumentes. Die so gewonnene Intensitätsdifferenz, nennen wir interferometrische PSF (IPSF):

$$\Delta S(r_0) = 4 \frac{J_1(2pr_0)}{2pr_0} = IPSF \quad (4)$$

Diese ist aufgrund des doppelten Argumentes bzgl. ihrer Nullstellen nur halb so breit wie die typische PSF des Systems, welche dem Betragsquadrat der Gl. (2) entspricht. Bzgl. der Halbwertsbreite ist die IPSF ca. 30% schmaler als die PSF.

Das direkte Verfahren ist ein Rasterverfahren, da hierbei schrittweise der Abstand zwischen Punktlichtquelle und Inversionsachse variiert werden muss. Im Gegensatz dazu, kann man im indirekten Verfahren die gesamte IPSF mit einer Aufnahme sichtbar machen, sofern man eine homogene, inkohärente Lichtquelle verwendet. Beim indirekten Verfahren entfällt die Integration, weil es in der Detektorebene zu einer Überlagerung der Bilder von theoretisch unendlich vielen, infinitesimal dichten, inkohärenten Punktlichtquellen kommt [3, 4].

3 Experiment - Holographische Umsetzung

Insbesondere das direkte Bildinversionsverfahren bedarf eines Rasterprozesses, bei dem das Objekt möglichst präzise, relativ zur optischen Achse schrittweise verschoben werden muss. Dies geht zu Lasten der Messzeit. Des Weiteren erhöht es die Stabilität des Systems, wenn man das Abrastern nicht am Objekt durchführen muss. Sowohl die Inversion, die Interferenz, als auch die Integration können mittels des Computers berechnet werden, sofern die kompletten Amplituden- und Phasenverteilungen in der Objektebene bekannt sind. In diesem Falle kann man die Lage der Inversionsachse in der Objektebene beliebig festlegen und somit den Rasterprozess auf den Computer auslagern, ohne weitere Aufnahmen machen zu müssen. Um die Amplituden- und Phasenverteilung zu erhalten, bietet sich die digitale Holographie an. Hierbei liefert die Aufnahme eines Bildfeldhologramms die Verteilung direkt in der Objektebene.

Zur Aufnahme des Hologramms ist ein Laser als Lichtquelle notwendig. Für das Bildinversionsverfahren ist jedoch die Verwendung räumlich inkohärenten Lichts erforderlich. Deswegen muss für dieses Verfahren die räumliche Korrelation der Bildpunkte in der Objektebene unterdrückt werden. Um dies zu erreichen, wird eine Streuscheibe beleuchtet und als Sekundärlichtquelle in die Objektebene abgebildet. Diese führt zu einer völlig statistischen Amplituden- bzw. Phasenverteilung. Nun muss man über mehrere Aufnahmen bei verschiedenen, diskreten Stellungen der Streuscheibe mitteln. Dabei ist die Folge der Beleuchtungsphase für zwei beliebige Punkte der Objektebene vollkommen unkorreliert. Das bedeutet, dass sie sich durch die Mittelung untereinander wie räumlich inkohärente Punkte verhalten. Die verschiedenen Stellungen der Streuscheibe lassen sich sehr schnell einstellen und können unabhängig vom Objekt und dem Beobachtungssystem realisiert werden. Insgesamt bleibt jedoch für jede einzelne Aufnahme die Kohärenz zwischen Beleuchtungswelle und für die Holographie notwendige Referenzwelle erhalten.

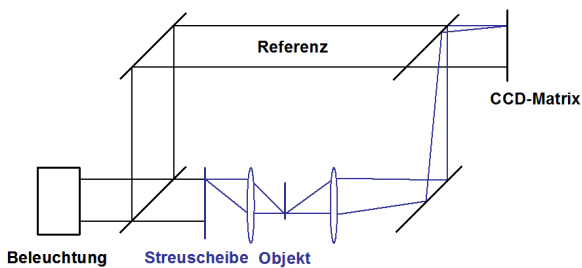


Abbildung 1 Aufbau zur Aufnahme des Bildfeldhologramms unter Verwendung der beleuchteten Streuscheibe als Sekundärlichtquelle

4 Ergebnisse

Für den Nachweis der Auflösungssteigerung wurde ein Mikroobjektiv mit einer $NA = 0,07$ verwendet, bei einer Wellenlänge von $632,8 \text{ nm}$. Als Vergleich dient die experimentell bestimmte PSF, die aus der Intensitätsverteilung des Bildes eines $1,3 \mu\text{m}$ großen Pinholes gewonnen wurde.

Die IPSF nach direktem Verfahren wurde gewonnen, indem ein Hologramm des Pinholes aufgenommen und dann für jede simulierte Position der optischen Achse in der Objektebene das zugehörige Signal gemäß obiger Beschreibung ermittelt wurde. So ergab sich eine um das Pinhole symmetrische Verteilung gemäß Gl. (4).

Für die indirekte Methode befand sich kein Objekt in der Objektebene und es wurde mittels Streuscheibe beleuchtet. Nach einer Mittelung über mehrerer Aufnahmen ergab sich auch hierbei die erwartete Verteilung um die zuvor beliebig gewählte optische Achse. Im folgenden sieht man den Schnitt durch diese

Verteilungen.

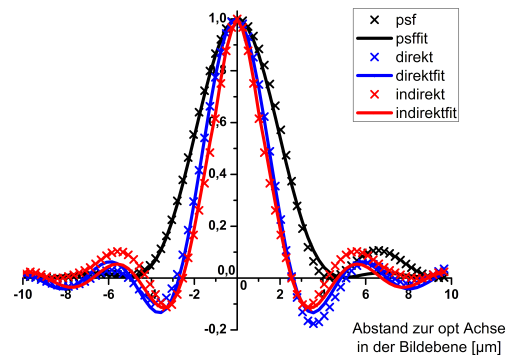


Abbildung 2 Schnitt durch die räumliche Verteilung sowohl der PSF, als auch der IPSF - direkt und indirekt

	PSF	IPSF-direkt	IPSF-indirekt
Nullstellenabstand	10,1 μm	5,36 μm	4,97 μm

Tabelle 1 Dargestellt sind die Abstände der ersten Nulldurchgänge der experimentell aufgenommenen PSF und IPSF

5 Zusammenfassung

Wir konnten experimentell eine Auflösungssteigerung mittels Bildinversionsverfahren sowohl qualitativ, als auch quantitativ nachweisen. Dieses wurde insbesondere holographisch umgesetzt, da dies den hierfür notwendigen Abrasterprozess auf den Computer auslagert und so kürzere Messzeiten und stabilere Systeme ermöglicht. Da für die Holographie jedoch Laser verwendet werden, ist es notwendig die räumliche Kohärenz der Punkte in der Objektebene untereinander zu unterdrücken. Dies ist durch die Beleuchtung über eine Streuscheibe und anschließende Mittelung erfolgreich realisiert worden.

Literatur

- [1] N. Sandeau and H. Giovannini, "Increasing the lateral resolution of 4pi fluorescence microscopes," J. Opt. Soc. Am. A **23**, 1089–1095 (2006).
- [2] K. Wicker and R. Heintzmann, "Interferometric resolution improvement for confocal microscopes," Optics Express **15**, 12,206–12,216 (2007).
- [3] K. Wicker, S. Sindbert, and R. Heintzmann, "Characterisation of a resolution enhancing image inversion interferometer," Optics Express **17**, 15,491–15,501 (2009).
- [4] D. Weigel, H. Babovsky, A. Kießling, and R. Kowarschik, "Investigation of the impulse response of an image inversion interferometer," Opt. Commun. **283**, 368–372 (2010).